

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus 2003 sampai dengan Oktober 2003 di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Diponegoro, Semarang.

3.2. Alat Dan Bahan

3.2.1. Alat

Blender, sentrifuge, neraca analitik, pH meter, kain penyaring, pemanas, batang magnet stirer, selofan, seperangkat gelas kimia, spektrofotometer.

3.2.2. Bahan

Benih kedelai dari BBI Palawija Jepara varietas Mahameru, Pangrango dan Kawi, amilum 1%, buffer fosfat, ammonium sulfat, barium klorida, DNS (Dinitrosalisilat), larutan glukosa standar, larutan Lowry A, larutan Lowry B, larutan BSA (Bovine Serum Albumin) standar, akuades.

3.3. Cara Kerja

3.3.1. Persiapan

- Benih dipilih yang tidak cacat dan mempunyai ukuran yang seragam.
- Benih dikelompokkan berdasarkan varietas :

V₁ : Varietas Mahameru

V₂ : Varietas Pangrango

V₃ : Varietas Kawi

- Benih direndam dalam air selama lima menit, benih yang baik akan tenggelam dan benih yang jelek akan terapung.
- Media yang digunakan untuk mengecambahkan adalah busa yang mempunyai pori-pori besar.
- Benih untuk uji perkecambahan, dikecambahkan dalam cawan petri, masing-masing berisi 15 benih
- Benih untuk uji aktivitas enzim amilase, dikecambahkan dalam cawan petri, masing-masing berisi 50 benih.
- Masing-masing perlakuan dengan ulangan sebanyak empat kali.

3.3.2. Uji Aktivitas Enzim Amilase

Kecambah kedelai tiap varietas (V_1 , V_2 , V_3) yang berumur dua hari diuji aktivitas enzim amilase.

a. Preparasi Larutan

Preparasi larutan dapat dilihat pada lampiran 15.

b. Persiapan Enzim

Kecambah kedelai tiap varietas yang berumur dua hari diambil 50 gr, diblender dengan 500 ml buffer fosfat 0,2 M pH 6,1 selama 15 menit. Campuran tersebut dibiarkan selama satu sampai dua jam pada temperatur 5°C . Homogenat kemudian disaring dengan kain dan filtrat yang didapat disentrifugasi pada kecepatan 3400 rpm selama 20 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan enzim kasar (Suhari, 2001).

c. Fraksinasi dengan Garam Amonium Sulfat

Amonium sulfat ditimbang, sesuai dengan yang dibuat untuk fraksinasi 30% – 50%. Amonium sulfat dimasukkan sedikit demi sedikit ke dalam supernatan dengan batang magnet stirer secara perlahan dan dilakukan dalam tempat yang direndam dalam es (penangas es). Campuran didiamkan dalam keadaan dingin selama satu malam. Campuran tersebut disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 30 menit sehingga diperoleh endapan dan filtrat. Endapan yang diperoleh dari fraksi tersebut dilarutkan dengan buffer fosfat 0,2 M dengan pH 6,1 (Scopes, 1982).

d. Proses Dialisis

Kantong selofan direbus dengan akuades sampai mendidih selama 30 menit lalu dicuci dengan akuades. Salah satu ujung selofan diikat dengan benang lalu dimasukkan ke dalam beker gelas yang sudah berisi larutan buffer fosfat 0,002 M dengan pH 6,1. Buffer diaduk dengan magnetic stirer dan diganti tiap 2 jam sekali. Buffer yang diganti diuji kandungan ammonium sulfat dengan BaCl_2 . Proses dialisis dihentikan jika cairan diluar membran selofan tidak terbentuk endapan lagi jika dengan penambahan BaCl_2 (Scopes, 1982).

e. Penentuan Aktivitas Enzim Amilase

e.1. Penentuan Aktivitas Enzim Amilase dengan Metode DNS (Chaplin and Kennedy, 1994)

- Larutan enzim 0,5 ml direaksikan dengan 0,5 ml substrat amilum 1%, kemudian ditambah dengan 5 ml DNS (Dinitrosalisilat), diinkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit.

- Reaksi enzimatik dihentikan dengan jalan memasukkan tabung sampel ke dalam air yang telah mendidih selama 5 menit.
- Sampel ditambah dengan 8 ml akuades.
- Absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang tertentu.
- Blangko dibuat dengan campuran yang sama tanpa diinkubasi tetapi langsung dipanaskan pada air yang telah mendidih
- Gula reduksi yang dihasilkan diukur dengan menggunakan metode DNS (Dinitrosalisilat) selisih gula reduksi yang diinkubasi merupakan gula reduksi sampel
- Kandungan gula reduksi ditentukan berdasarkan kurva standar glukosa
- Aktivitas enzim diukur berdasarkan unit enzim yang mampu membebaskan satu mikromol gula reduksi per menit pada kondisi tertentu.

Aktivitas enzim = unit/ml substrat/menit

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{P(x-y)}{\text{BM Glukosa} \times 10 \text{ menit}}$$

Keterangan :

P = Pengenceran

X = absorbansi sample

Y = absorbansi blanko

e. 2. Pembuatan Kurva Glukosa Standar

Larutan glukosa standar dengan konsentrasi yang berbeda (Lampiran 16) masing-masing diambil 1 ml, kemudian ditambahkan 5 ml reagen DNS, dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit, lalu didinginkan. Larutan ditambah 8 ml akuades. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang

560 nm sehingga diperoleh garis regresi hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi larutan glukosa standar (Lampiran 12). Berdasarkan garis regresi ini maka aktivitas enzim amilase dapat diketahui (Soedarmadji, 1984).

3.3.3. Uji Perkecambahan Benih

Pengamatan persentase perkecambahan dihentikan sampai ada perlakuan yang berkecambah 100%.

3.4. Parameter

Parameter yang diamati adalah :

- Aktivitas enzim amilase
- Panjang hipokotil

Panjang hipokotil diukur panjang dari kotiledon sampai perbatasan dengan radikula.

- Panjang Radikula

Radikula berwarna putih dan terdapat bulu-bulu akar.

- Berat basah kecambah

Berat basah kecambah diperoleh berat kecambah pada saat masih segar.

- Berat kering kecambah

Berat kering kecambah diperoleh dengan cara pengeringan kecambah pada suhu 70°C selama 24 jam atau sampai mencapai berat konstan.

- Persentase perkecambahan

$$\text{Persentase perkecambahan} = \frac{\text{Jumlah kecambah yang dihasilkan}}{\text{Jumlah benih yang diuji}} \times 100\%$$

Parameter pendukungnya adalah suhu lingkungan.

- Reaksi enzimatis dihentikan dengan jalan memasukkan tabung sampel ke dalam air yang telah mendidih selama 5 menit.
- Absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang tertentu.
- Blangko dibuat dengan campuran yang sama tanpa diinkubasi tetapi langsung dipanaskan pada air yang telah mendidih
- Gula reduksi yang dihasilkan diukur dengan menggunakan metode DNS (Dinitrosalisilat) selisih gula reduksi yang diinkubasi merupakan gula reduksi sampel
- Kandungan gula reduksi ditentukan berdasarkan kurva standar glukosa
- Aktivitas enzim diukur berdasarkan unit enzim yang mampu membebaskan satu mikromol gula reduksi per menit pada kondisi tertentu.

Aktivitas enzim = unit/ml substrat/menit

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{P (x-y)}{\text{BM Glukosa} \times 10 \text{ menit}}$$

Keterangan :

P = Pengenceran

X = absorbansi sample

Y = absorbansi blanko

e. 2. Pembuatan Kurva Glukosa Standar

Larutan glukosa standar dengan konsentrasi yang berbeda (Lampiran 16) masing-masing diambil 1 ml, kemudian ditambahkan 5 ml reagen DNS, dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit, lalu didinginkan. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 560 nm sehingga diperoleh garis regresi hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi larutan glukosa standar

(Lampiran 12). Berdasarkan garis regresi ini maka aktivitas enzim amilase dapat diketahui (Soedarmadji, 1984).

3.3.3. Uji Perkecambahan Benih

Pengamatan persentase perkecambahan dihentikan sampai ada perlakuan yang berkecambah 100%.

3.4. Parameter

Parameter yang diamati adalah :

- Aktivitas enzim amilase
- Panjang hipokotil

Panjang hipokotil diukur panjang dari kotiledon sampai perbatasan dengan radikula.

- Panjang Radikula

Radikula berwarna putih dan terdapat bulu-bulu akar.

- Berat basah kecambah

Berat basah kecambah diperoleh berat kecambah pada saat masih segar.

- Berat kering kecambah

Berat kering kecambah diperoleh dengan cara pengeringan kecambah pada suhu 70°C selama 24 jam atau sampai mencapai berat konstan.

- Persentase perkecambahan

$$\text{Persentase perkecambahan} = \frac{\text{Jumlah kecambah yang dihasilkan}}{\text{Jumlah benih yang diuji}} \times 100\%$$

Parameter pendukungnya adalah suhu lingkungan.

3.5. Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 perlakuan dan 4 kali ulangan. Perlakuannya adalah V_1 (Varietas Mahameru), V_2 (Varietas Pangrango) dan V_3 (Varietas Kawi).

3.6. Analisis Data

Data yang diperoleh, dianalisis dengan *analysis of varian* (ANOVA). Jika ada perbedaan nyata antar perlakuan dilanjutkan dengan uji Duncan dengan taraf signifikan 5%.

Analisis yang digunakan untuk mengetahui hubungan antara aktivitas enzim amilase dengan perkecambahan digunakan uji korelasi sederhana, dimana :

- regresi linier sederhana

$$Y = a + bx$$

$$b = \frac{n \sum XY - (\sum X)(\sum Y)}{n \sum X^2 - (\sum X)^2}$$

- persamaan korelasi

$$r = \frac{n \sum XY - (\sum X)(\sum Y)}{\sqrt{\{n \sum X^2 - (\sum X)^2\} \{n \sum Y^2 - (\sum Y)^2\}}}$$

(Sudjana, 1991).